

(54) PRODUCTION OF RED DYESTUFF BY CULTURE CELL OF LIMONIUM LATIFOLIUM O. KUNTZE

(11) 4-4885 (A) (43) 9.1.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-104644 (22) 20.4.1990
 (71) MITSUI ENG & SHIPBUILD CO LTD (72) AKIHIDE ITO
 (51) Int. Cl⁵. C12P1/00, C09B61/00// (C12P1/00, C12R1/91)

PURPOSE: To stably and efficiently obtain the title dyestuff useful as a coloring matter for foods, having high stability, by culturing cells to produce a starches red dyestuff in a liquid medium having a specific pH.

CONSTITUTION: Culture cells of Limonium Latifolium O. Kuntze prepared by subjecting a callus derived from starches tissue such as Limonium sinuatum Mill are inoculated into a liquid medium such as Murashige-Skoog medium having pH 7-4 (preferably pH 5-4) and subjected to roller tube culture in white light having 100-20,000 lux (preferably 2,000 lux) at about 25°C to give the objective dyestuff.

(54) FERMENTATIVE PRODUCTION OF L-LYSINE

(11) 4-4887 (A) (43) 9.1.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-104459 (22) 20.4.1990
 (71) AJINOMOTO CO INC (72) YUTAKA MURAKAMI(2)
 (51) Int. Cl⁵. C12P13/08, C12N1/20// (C12P13/08, C12R1/15)(C12N1/20, C12R1/15)

PURPOSE: To industrially obtain L-lysine with reduced cooling load without requiring an amino acid by culturing a variant belonging to the genus *Corynebacterium* in a medium.

CONSTITUTION: A variant [preferably *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12,521 (FERM P-11,409), *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12,522 (FERM P-11,410), *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12,533 (FERM P-11,411), or *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12,524 (FERM P-11,412)] belonging to the genus *Corynebacterium*, capable of growing at $\geq 40^{\circ}\text{C}$, having resistance to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine and producing L-lysine is subjected to shaking culture or aerated spinner culture in a medium preferably at 35-45°C for 2-4 days to give L-lysine.

(54) PRODUCTION OF AMINO ACID BY FERMENTATION

(11) 4-4888 (A) (43) 9.1.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-104511 (22) 20.4.1990
 (71) AJINOMOTO CO INC(2) (72) YOSHIO KAWAHARA(4)
 (51) Int. Cl⁵. C12P13/08, C12P13/14// (C12P13/08, C12R1/15)(C12P13/14, C12R1/15)

PURPOSE: To obtain an amino acid in high fermentation efficiency by making trehalase exist in a culture solution of microorganism.

CONSTITUTION: Trehalase having 0.5-100 units is made to exist in a culture solution of microorganism and the microorganism is aerobically cultured at pH 4-9 at 40-60°C to give the objective amino acid.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-4887

⑬ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成4年(1992)1月9日
C 12 P 13/08 A 8931-4B
C 12 N 1/20 A 7236-4B
// (C 12 P 13/08
C 12 R 1:15)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:15)

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑮ 発明の名称 L-リジンの発酵的製造法

⑯ 特 願 平2-104459

⑰ 出 願 平2(1990)4月20日

⑱ 発 明 者 村 上 豊 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 三 輪 治 文 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 中 森 茂 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
⑳ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外3名

明 細 書

1. 発明の名称

L-リジンの発酵的製造法

2. 特許請求の範囲

(1) コリネバクテリウム属に属し、40℃以上でも生育しうる、かつS-(2-アミノエチル)-L-システインに耐性を有するL-リジン生産性変異株を培地に培養して培養液中にL-リジンを生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-リジンの発酵的製造法。

(2) コリネバクテリウム属に属し、40℃以上でも生育しうる、かつS-(2-アミノエチル)-L-システインに耐性を有する下記いずれかのL-リジン生産性変異株。

コリネバクテリウム・サーモアミノグネス
AJ 12521、FERM P-11409、
コリネバクテリウム・サーモアミノグネス

AJ 12522、FERM P-11410、

コリネバクテリウム・サーモアミノグネス

AJ 12523、FERM P-11411、

コリネバクテリウム・サーモアミノグネス

AJ 12524、FERM P-11412、

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、コリネバクテリウム属に属し、40℃以上でも生育しうる、かつS-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)に耐性を有するL-リジン生産性変異株を培地に培養して培養液中にL-リジンを生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-リジンの発酵的製造法及びこのようなL-リジンの発酵的製造法に好適に使用することができる新規なL-リジン生産性変異株そのものに関する。

(従来の技術)

家畜飼料の添加物等として重要な用途を有するL-リジンは主として発酵法により製造されている。

しかして、L-リジンの発酵的工業生産において経済性を高める技術的な要因はいくつかある。例えば、対糖収率の向上、L-リジンの蓄積量の向上、培養時間の短縮化等々である。

其の他に要因として重要なものに培養温度の高温化がある。培養温度はL-リジンの発酵至適温度で行れるが従来のL-リジン生産菌を使用する場合、この温度は通常28〜35℃である。培養が開始されると発酵熱が発生するためにそのまま放置すれば培養液の温度は上昇し、L-リジンの生成は著しく低下する。培養液の温度を至適に維持するためには、発酵槽内に熱交換機を設置し、これに冷水を循環させることが必要となる。冷水を得るためには冷凍機を使用しなければならない

産性変異株は、通常のL-リジン生産菌(30〜35℃で生育)を変異処理によりより高温(37〜45℃)でL-リジンを生産できるように改良して得たものであるところ、数段階の変異処理のため、前記のように、ホモセリン、ロイシン及びバリンのアミノ酸の複合要求性となっており、実用性に欠ける。

特開昭58-170487号公開特許公報には、プレバクテリウム属に属し、ビルビン酸キナーゼ活性が低下し、かつL-リジン生産能を有し、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)耐性を任意的に併有する変異株を培養して培養液中にL-リジンを生成・蓄積せしめ、これを採取する発酵法によるL-リジンの製造法が記載されている。

しかして、この方法における発酵温度は20〜40℃とされているが、唯一の実施例(実施例1)で

が発生す 発酵熱が莫大であるため冷凍機で消費する電気エネルギーも大きなものとなっている。従ってL-リジン発酵の培養温度を従来より上昇させることが出来れば冷却負担が減少し、もってL-リジンの工業生産の経済性が高められるものである。

L-リジン発酵において培養温度の高温化を図ったものとしては、韓国特許出願公告85-1231号公告特許公報(1985. 8. 23公告)に記載の方法がある。すなわち、この方法は、コリネバクテリウムに属し、リジンアナログ耐性及び温度耐性を有し、ホモセリン、ロイシン及びバリンを複合要求するL-リジン生産性変異株T R-3579(KFCC 10065)を使用し、これを培地で高温培養(37〜45℃)して培養液中にL-リジンを生成・蓄積せしめるものである。

しかして、この方法で使用されるL-リジン生

採用されている温度が30℃であることから推定されるように、また本発明者の追試実験によっても確認されたように、発酵温度範囲の上限40℃近辺では使用菌の生育は顕著でなく、顕著なL-リジンの生成・蓄積は見られない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、実用に耐えうるL-リジンの高温発酵菌、意いては実用に耐えうるL-リジンの高温発酵法を提供することを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本発明者は前記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、40℃以上でも生育可能な高温性のコリネバクテリウム属の細菌にAEC耐性を付与してL-リジン生産菌に改良した変異株を使用すれば前記の目的を達成し得ることを見出し、このような知見に基いて本発明を完成した。

すなわち、本発明は、コリネバクテリウム属に

属し、40℃以上でも生育しうる、かつAECに耐性を有するL-リジン生産性変異株を培地に培養して培養液中にL-リジンを生成・蓄積せしめ、これを採取することの特徴とするL-リジンの発酵的製造法及びこのようなL-リジンの発酵的製造法に好適に使用することができる新規なL-リジン生産性変異株そのものに関する。

以下、本発明について詳述する。

本発明で使用できるコリネバクテリウム属に属し、40℃以上でも生育し得、かつAEC耐性のL-リジン生産性変異株は、例えば、コリネバクテリウム属に属し40℃以上でも生育可能な細菌、例えばL-グルタミン酸生産菌、を親株とし、これを変異処理して得ることができる。

このような親株としては、例えば特開昭63-240779号公開特許公報に記載の天然芽より分離したコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

(*Corynebacterium thermoaminogenes*)に属する細菌を挙げることができる。

親株を変異処理に付してL-リジン生産性変異株を採取するには格別の困難はなく、従来公知の発酵耐性変異株採取方法によることができ、例えば、親株が生育出来ない、AECを1~2g/dl含有する普通寒天平板培地に、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニン等で変異処理(250μg/ml、30℃で30分)した親株を塗布し、40℃以上で例えば43℃で培養した結果生成したコロニーを採取し、目的の変異株を得ることができる。

このようにして採取されたL-リジン生産性変異株としては、例えば、次のものを挙げることができる：

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
(*Corynebacterium thermoaminogenes*)AJ 12521;
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

AJ 12522; コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ 12523; 及びコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ 12524。

これらの変異株の菌学的性質は第1表の1~6の通りである。

因みに、親株コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ 12308及びAJ 12309はいずれも工業技術院微生物工業技術研究所に国際寄託され、受託番号FERM BP-1540及びFERM BP-1541をそれぞれ付与されている。また、変異株コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ 12521、AJ 12522、AJ 12523及びAJ 12524もいずれも上記研究所に寄託され、受託番号FERM P-11409、FERM P-11410、FERM P-11411及びFERM P-11412をそれぞれ付与されている。

第 1 表 の 1

	親 株		変 異 株		親 株		変 異 株	
	AJ 12308 FERM BP-1540		AJ 12521 FERM P-11409	AJ 12522 FERM P-11410	AJ 12309 FERM BP-1541		AJ 12523 FERM P-11411	AJ 12524 FERM P-11412
形 態 (1) 細胞の形、大きさ	0.7 ~1.0 ×1.0 ~4.0 ミクロンの桿菌、細胞の両端は丸味を有する。スナッピング分裂にもとづくV形配列がみられる。		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(2) 多形性の有無	多形性は認められないが培養の時期によっては稀に長大桿状細胞、肥大細胞、幼稚な分枝細胞が存在する。		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(3) 運動性の有無	無 し		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(4) 胞子の有無	無 し		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(5) グラム染色性	陽 性		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(6) 抗 酸 性	陰 性		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左

第 1 表 の 2

	親 株		変 異 株		親 株		変 異 株	
	AJ 12308		AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309		AJ 12523	AJ 12524
生理的性質 (1) 肉汁寒天平板培養	豊富ないし中等度の生育、コロニーは円形、平滑、全円丘状、光沢あり、不透明ないし半透明、鈍い黄色、バター様		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(2) 肉汁寒天斜面培養	豊富ないし中等度の生育、糸状、光沢あり、鈍い黄色		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(3) 肉汁液体培養	中等度の生育、ほぼ均等に濁るが若干の菌体の沈降もみられる		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養	中等度の生育、ゼラチンを液化しない		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左
(5) リトマスミルク	微弱にアルカリ性化する、液化凝固はみられない		同 左	同 左	同 左		同 左	同 左

第 1 表 の 3

	親 株	変 異 株		親 株	変 異 株	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524
生理的性質						
(1) 硝酸塩の還元	還元する	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(2) 脱窒反応	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(3) MRテスト	陰性ないし微陽性	同 左	同 左	陰 性	同 左	同 左
(4) VPテスト	陽 性	同 左	同 左	陰 性	同 左	同 左
(5) インドールの生成	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(6) 硫化水素の生成	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(7) デンプンの加水分解	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(8) クエン酸の利用	Koser の培地で生育しない、Christensen の培地で生育し、培地をアルカリ性にする	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(9) 無酸素系の利用	硝酸塩を利用しない、アンモニウム塩を利用する	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左

第 1 表 の 4

	親 株	変 異 株		親 株	変 異 株	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524
(00) 色素の生成	菌体外に色素を生成しない	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(01) ウレアーゼテスト	陰性ないし微陽性	同 左	同 左	陰 性	同 左	同 左
(02) オキシダーゼ	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(03) カタラーゼ	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(04) 生育の範囲	pH 7～8.5で良好な生育をする、35～45℃で良好な生育をする、46～50℃で微かな生育が認められる	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(05) 酸素に対する態度	好気性ないし通性嫌気性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(06) O-Fテスト (ブドウ糖)	発酵的に生育し、酸を生成する	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左

第 1 表 の 5

	親 株	変 異 株		親 株	変 異 株	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524
⑦ 糖からの酸生成						
①L-アラビノース	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
②D-キシロース	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
③D-グルコース	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
④D-マンノース	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑤D-フラクトース	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑥D-ガラクトース	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑦ 変 芽 糖	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑧ シ ョ 糖	陽 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑨ 乳 糖	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑩ トレハロース	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑪ D-ソルビット	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑫ D-マンニット	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑬ イノシット	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑭ グリセリン	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
⑮ デン ブ ン	陰 性	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左

第 1 表 の 6

	親 株	変 異 株		親 株	変 異 株	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524
その他の特徴的性質						
(1) 温度耐性	スキムミルク中キャピラリー法で 60℃ - 10分で生残する、 65℃ - 10分で死滅する	同 左 同 左	同 左 同 左	スキムミルク中キャピラリー法で 55℃ - 10分で生残する 60℃ - 10分で死滅する	同 左 同 左	同 左 同 左
(2) 塩化ナトリウム耐性	5%食塩含有培地で生育する	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(3) 栄養要求性	生育にビオチンを要求する	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(4) DNA の塩基組成 (Tm法)	60.2%GC	同 左	同 左	59.5%GC	同 左	同 左
(5) 細胞壁に含まれる 2 糖基性アミノ酸	メソジアミノピメリン酸	同 左	同 左	同 左	同 左	同 左
(6) 分 離 液	果 実	-	-	野 梨	-	-

本発明のL-リジン生産性変異株を使用してL-リジンを生成・蓄積せしめる培地、すなわち、本発明で使用する培地は、従来公知のL-リジン生産培地と同じでよく、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じて使用する微生物が要求する有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地が使用できる。炭素源としては使用する変異株の利用可能なものであれば良く、例えばグルコース、シュークロース、マルトース、これらを含む澱粉水解物、蜂蜜等の糖類、エタノール、プロパノール等のアルコール類、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、更に菌株によってはノルマルパラフィン等も単独又は他の炭素源と併用して用いられる。窒素源としては酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩類、尿素、アンモニア、更には肉エキス等、無機又は有機の窒素源が使用される。無機塩類として

が使用し得るが、好ましくはL-リジン生産活性の高い35~45℃である。後記実施例2及び3は実験室スケールにおいて発酵温度を43℃に制御しつつL-リジンの蓄積生成・蓄積を実証している。

これより商業的スケールでの発酵熱除去のための冷却負担を試算してみると、例えば容量200klの発酵タンクを使用してL-リジン発酵を行った場合、従来公知のL-リジン生産菌の至適発酵温度例えば30℃を維持するための冷却負担は1バッチ当り10千冷凍トン(JRT)であったのに、対し、本発明のL-リジン生産性変異株を使用して発酵温度を43℃を超えないようにするための冷却負担は1バッチ当り1千冷凍トン(JRT)となる。このように、本発明によれば冷却負担を9割削減することが可能となる。

は、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 等通常使用されるもので良い。有機微量栄養素としてはビタミン、脂肪酸、核酸、更にはこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、蛋白加水分解物が使用される。

培養は好氣的条件下で行うことが望ましく、培養期間中 pHを5~9好ましくは7~8.5、温度を使用菌の生育温度すなわち約25~50℃、好ましくは高いL-リジン生産活性維持の理由から約35~約45℃の範囲内となるように制御しつつ2~4日間最速培養又は過気攪拌培養することによりL-リジンが基質培養液中に生成・蓄積される。

培養液からL-リジンを回収する方法は公知の方法に従って行なえば良く、通常のイオン交換樹脂法、晶析法等を適宜組合せて回収される。

本発明によるL-リジンの発酵温度は、前記のように、使用菌の生育温度、すなわち約25~50℃

(実施例)

以下、本発明を実施例により更に説明する。

実施例1 (変異株の採取)

コリネバクテリウム・サーモアミノグネスAJ12308を常法により、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにて処理(250mg/ml、30℃で30分)した後、下に示す最少培地に、AECを1.5g/dl添加した培地で43℃で生育したコロニーを採取した。

最少培地組成:

グルコース	2.0 g/dl
尿 素	0.25 g/dl
硝酸アンモニウム	1.0 g/dl
KH_2PO_4	0.1 g/dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g/dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg/dl
L-アラニン	50 mg/dl
ニコチン酸アミド	0.5 mg/dl

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1.0	mg/dl
ビオチン	5.0	μg/dl
サイアミン塩酸塩	10	μg/dl
NaCl	5	mg/dl
pH	7.2	

この様にして得られた変異株の内、L-リジン生産能のすぐれた変異株としてA J 12521及びA J 12522を採取した。

又、同様の方法により、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスA J 12309を親株として、A J 12523及びA J 12524を採取した。

このようにして得られた変異株4株を、あらかじめグルコース・フイヨン寒天培地上に43℃で生育させ、それぞれ1白金耳づつ、500ml容の瓶とうフラスコに分注し、殺菌した下記組成の培地20mlに接種した。

実施例2

下記の組成の水性培地を20ml、500ml容瓶とうフラスコに分注し、110℃にて10分間蒸気殺菌した。

培地組成：

グルコース	10	g/dl
硫酸アンモニウム	4.5	g/dl
KH_2PO_4	0.1	g/dl
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	g/dl
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	mg/dl
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1.0	mg/dl
ビオチン	5.0	μg/dl
サイアミン塩酸塩	20	μg/dl
大豆タンパク塩酸加水分解液		
菌体物（乾固率7%）	1.5	ml/dl
炭酸カルシウム（別殺菌添加）	5	g/dl
pH	7.0	

上記の如く調製したフラスコ中の培地に、あら

培地組成：

ビート糖蜜（グルコース換算）	10	g/dl
硫酸アンモニウム	5	g/dl
KH_2PO_4	0.1	g/dl
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	40	mg/dl
ビオチン	50	μg/dl
炭酸カルシウム（別殺菌添加）	5	g/dl
pH	7.0	

これらを43℃で72時間培養をおこなったところ第2表のごとくリジンを蓄積した。

第2表

菌株	L-リジン蓄積濃度 (g/dl)
A J 12521	3.2
A J 12522	2.9
A J 12523	2.8
A J 12524	3.0

はじめグルコース・フイヨンスラント上で生育せしめたコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスA J 12521を1白金耳接種し、それらを43℃にて72時間瓶とう培養した。

72時間培養後の培地中のL-リジン生成量を、酸性-銅ニンヒドリン反応を用いる比色法によって測定した結果、L-リジンが3.0g/dlであった。

さらに、同様にして培養したフラスコ50本分の培養終了液を集め、遠心分離によって、菌体およびカルシウム塩を除いた上清液約1ℓを強酸性イオン交換樹脂（「アンバーライト」IR-120（OH型））に通過させ、L-リジンを吸着させた。ついで、3%アンモニア水で吸着したL-リジンを溶出し、溶出液を減圧濃縮した。濃縮液に塩酸を添加した後冷却し、L-リジンをL-リジン塩酸塩2水加物として析出させ、結晶26.5gを得た。

実施例3

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスA J

12523およびその親株A J 12309をそれぞれスラント上より1白金耳かきとり、下記種培養水性培地50mlに接種し、18時間、43℃にて通気攪拌培養をおこなって種培養液を調製した。

種培養培地組成：

グルコース	1.5 g / dl
酢酸アンモニウム	0.3 g / dl
尿 素	0.1 g / dl
KH_2PO_4	0.1 g / dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g / dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg / dl
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg / dl
ビオチン	5.0 μg / dl
サイアミン塩酸塩	20 μg / dl

ニコチン酸アミド 1.0 mg / l

大豆タンパク塩酸加水分解液

蛋白物（総窒素7%） 3.0 ml / dl

pH 7.2

培養液中に、酢酸と酢酸アンモニウムとの混合液（酢酸：酢酸アンモニウムとの混合液のモル比は1：0.25、混合液の酢酸濃度は80%）を培地のpHを7.2～8.0の間に保持するように添加して43℃で、55時間培養を行った。

結果を、第3表に示す。

第 3 表	
使用菌株	リジン 濃 度 (g / dl)
A J 12523	3.2
(親) A J 12309	0.03

大豆タンパク塩酸加水分解液

蛋白物（総窒素7%） 2.0 ml / dl

pH 7.5

一方、1l容小型ガラス製ジャー・フアーメンターに下記の組成より成る主発酵水性培地を300ml充分注し、常法により殺菌した。

これらに上記の種培養液をそれぞれ15ml充分接種し、43℃にて通気攪拌培養を開始した。

主発酵培地組成：

グルコース	2.0 g / dl
酢酸アンモニウム	0.5 g / dl
尿 素	0.2 g / dl
KH_2PO_4	0.1 g / dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g / dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg / dl
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg / dl
ビオチン	5.0 μg / l
サイアミン塩酸塩	50 μg / l

A J 12323の発酵終了液300mlから実施例2と同様の方法により、1.0gのL-リジン塩酸塩2水加物結晶を得た。

実施例4

実施例2で用いた培地と同じ組成の培地20mlを500ml容瓶とうフラスコに入れ、110℃で10分間蒸気殺菌した。これに、あらかじめグルコース・フィヨンスラント上で生育させたコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスA J 12524を1白金耳接種し、43℃にて50時間振とう培養した。

この培養液0.2mlをガラス製逆心チューブにとり、冷生理用食塩水5mlを添加し、攪拌の後、4500 rpm、10分の遠心分離に付し、上清をすてた。

0.2Mリン酸バッファ(pH 7.5) 1.5mlと下記反応液1.5mlとを加え、攪拌し、固体をけん濁し、43℃で振とう反応(120rpm)を2時間行った。

反応液：

グルコース	1	g / dl
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.4	g / dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04	g / dl
ビオチン	500	$\mu\text{g} / \text{dl}$
pH	7.5	

その後遠心分離 (4500 rpm, 10分) し、その上澄液の L-リジン濃度を液体クロマトグラフィーで分析した。その結果、0.2 g / dl の L-リジンが蓄積していたことがわかった。

(発明の効果)

本発明により、発酵熱除去のための冷却負担が削減されたしかもアミノ酸を必要としない実用に耐え得る L-リジンの工業的生産方法が提供された。